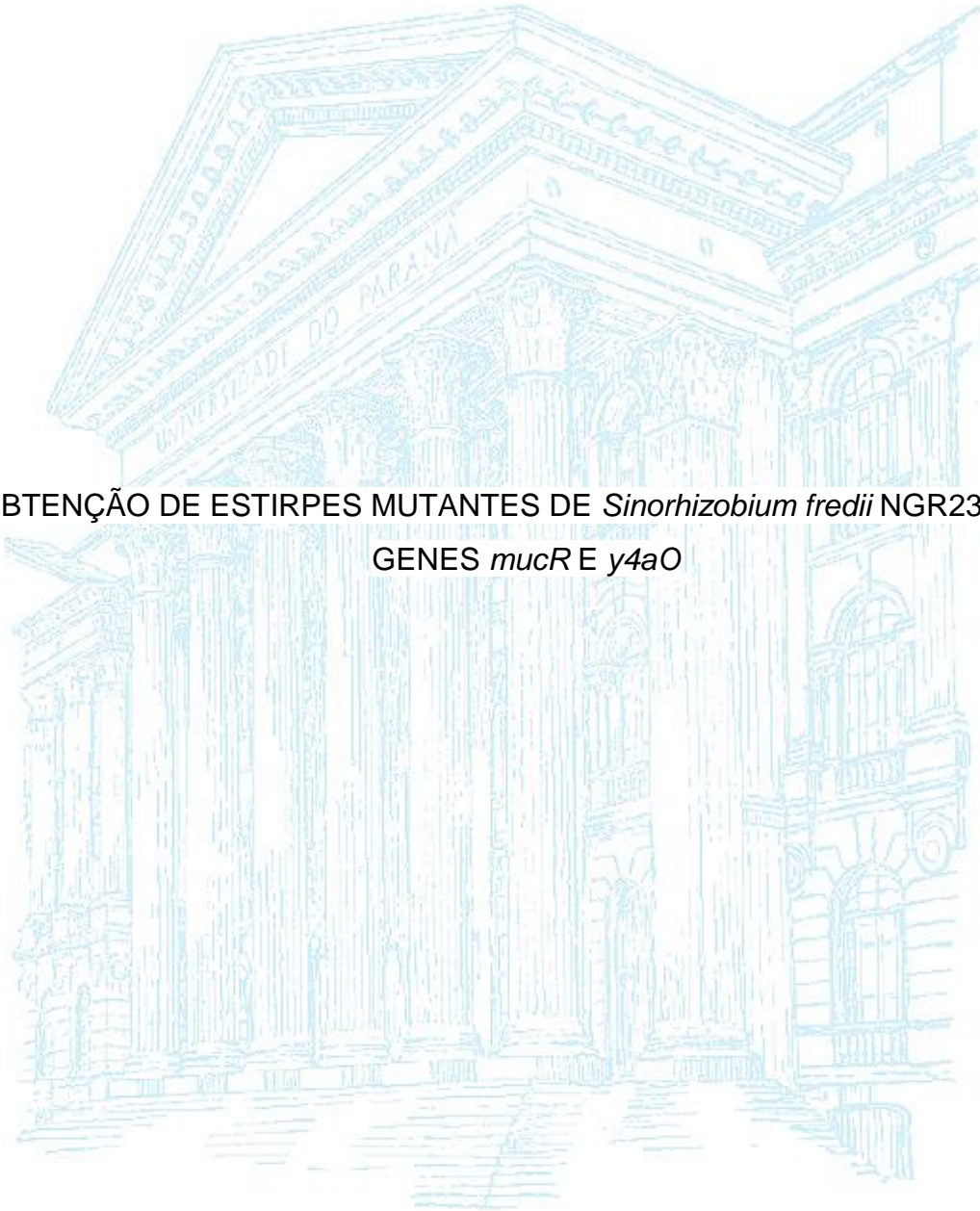


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCAS EDUARDO CHUKEVIK



OBTENÇÃO DE ESTIRPES MUTANTES DE *Sinorhizobium fredii* NGR234 NOS  
GENES *mucR* E *y4aO*

CURITIBA

2018

LUCAS EDUARDO CHUKEVIK

OBTENÇÃO DE ESTIRPES MUTANTES DE *Sinorhizobium fredii* NGR234 NOS  
GENES *mucR* E *y4aO*

Monografia apresentada como requisito parcial para  
obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas  
do Setor de Ciências Biológicas da Universidade  
Federal do Paraná.

Orientadora: Ana Claudia Bonatto  
Co-orientadora: Roseli Wassem

CURITIBA

2018

## **AGRADECIMENTOS**

Sou grato à minha avó por ter me criado e ter sido meu alicerce durante toda minha vida. Seus ensinamentos e conhecimentos me levaram a buscar tudo que eu tenho conquistado. Me ensinou a ser forte e a não desistir dos meus sonhos independentes dos problemas e dificuldades. Embora não esteja mais completamente sã um dos meus maiores motivos para continuar e terminar tudo que eu comecei é por você. Meu amor pela senhora me dá forças para continuar com cabeça erguida todos os dias.

Agradeço a todos os amigos que entraram durante minha vida nesses últimos anos durante a graduação e que aguentaram todos os altos e baixos dentro da universidade.

Sou muito grato a todos que fazem parte do LIPB (Laboratório de Interação Planta-Bactéria) que me ajudaram a conduzir este trabalho e que sempre foram amáveis e me dão alegrias de trabalhar em um lugar maravilhoso com ambiente acolhedor.

Agradeço a minha orientadora Ana Claudia Bonatto, primeiro por ter me dado a oportunidade de trabalhar com ela nos projetos de pesquisa do Laboratório e por me orientar nesses 2 últimos anos e me conduzir a elaboração desse trabalho.

## RESUMO

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico realizado por organismos diazotróficos tem um papel importante na ciclagem desse elemento. Os rizóbios são bactérias que possuem essa capacidade de catalisar as reações necessárias entre o nitrogênio atmosférico reduzindo até compostos nitrogenados assimiláveis por outros organismos. A fixação biológica de nitrogênio é de grande importância devido à grande necessidade deste elemento para o desenvolvimento de cultivares e ao alto custo de obtenção de outras formas, tendo grande atrativo para a agricultura sustentável. *Sinorhizobium fredii* NGR234 é estudado devido sua faixa hospedeira de plantas, pois consegue nodular 112 gêneros de leguminosas. A troca dos sinais moleculares entre as plantas e o rizóbio tem sido muito estudado. Genes como *nodD1* tem seu papel bem elucidado quanto sua importância nessa conversa molecular entre os organismos. Esse gene está inserido no plasmídeo simbiótico de *S. fredii* NGR234 e em sua proximidade estão outros genes que podem fazer parte de um mesmo operon e estar correlacionados. Um destes genes é *syrB*, o qual em trabalhos anteriores do grupo, foi sugerido estar ligado a resposta entre plantas diferentes e *S. fredii* NGR234. Este trabalho teve como objetivo a obtenção de duas estirpes mutantes para os genes *mucR* e *y4Ao*, que estão localizados próximos aos genes *nodD1* e *syrB*. Para isso foi realizada a deleção em fase de parte da sequência destes genes utilizando fragmentos iniciais e finais de cada gene amplificados a partir do DNA genômico de *S. fredii* NGR234. Estes fragmentos foram ligados para construir o fragmento truncado do gene *mucR* (*mucR/Del*) e fragmento truncado do gene *y4aO* (*y4aO/Del*). O fragmento *mucR/Del* foi inserido em células de NGR234 originando uma estirpe simples recombinante que contém a inserção do fragmento truncado mais o plasmídeo pK18mobsacB ligado ao gene selvagem *mucR*. Os fragmentos do *y4aO/Del* estão sendo ligados ao vetor pK18mobsacB para conjugação com células de NGR234. Após a obtenção de duplos recombinantes, o fenótipo destas estirpes mutantes com deleção desses genes será avaliado quanto a capacidade de nodulação de diferentes plantas hospedeiras de *S. fredii* NGR234.

Palavras-chaves: *Sinorhizobium fredii* NGR234, *mucR*, *y4Ao*, nodulação.

## ABSTRACT

The biological fixation of atmospheric nitrogen by diazotrophic organisms plays an important role in the cycling of this element. *Rhizobia* are bacteria that possess the ability to catalyze the necessary reactions to convert atmospheric nitrogen in ammonium. The biological nitrogen fixation is of great importance due to the great necessity of this element for the development of cultivars and the high cost of obtaining of other forms, having great attraction for the sustainable agriculture. *Sinorhizobium fredii* NGR234 is a diazotroph with a large range of host plants, once this bacteria is capable to nodulate 112 genera of legumes. The exchange of molecular signals between plants and rhizobia has been extensively studied. Genes as *nodD1* have their role well elucidated in this molecular conversation between organisms. This gene is present in the symbiotic plasmid of *S. fredii* NGR234 and is surrounded by other genes, which may be part of the same operon and, possible, they could have correlated functions. One of these genes is *syrB*, which in a previous work of the group was suggested to be involved in the molecular response of *S. fredii* NGR234 and different plants. This work aimed to obtain two mutant strains for the *mucR* and *y4aO* genes, which are located close to the *nodD1* and *syrB* genes. Constructions of these two genes with in frame deletions were obtained using initial and final fragments of each gene. These fragments were amplified from genomic DNA of *S. fredii* NGR234 using specific primers. These fragments were ligated to construct a truncated gene fragment *mucR* (*mucR/Del*) and *y4aO* truncated gene (*y4aO/Del*). The *mucR/Del* fragment was transferred to NGR234 cells by conjugation to yield a single recombinant strain containing the insertion of the truncated fragment plus the plasmid pK18mobsacB linked to the wild-type gene *mucR*. The fragments of the *y4aO/Del* will be inserted into the vector pK18mobsacB and transferred to NGR234 cells. After obtaining double recombinants, the phenotype of these strains with deletion mutants of these genes will be evaluated for nodulation ability of host plants of *S. fredii* NGR234.

Keywords: *Sinorhizobium fredii* NGR234, *mucR*, *y4aO*, nodulation.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – POSIÇÃO DOS GENES <i>syrB</i> , <i>mucR</i> E <i>y4Ao</i> EM <i>S. fredii</i> NGR234. .....	18
FIGURA 2 – REGIÃO GENÔMICA DE INSERÇÃO DOS GENES E PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÕES DOS FRAGMENTOS PARA DELEÇÃO DO GENE <i>mucR</i> .....	26
FIGURA 3 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM FRAGMENTO AMPLIFICADO RESULTANTE DA PCR COM OS PRIMERS <i>dmucR</i> 3 E <i>dmucR</i> 4. ....	27
FIGURA 4 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM pTZ57R/T- <i>mucR2</i> DIGERIDO COM <i>EcoRI</i> E <i>XbaI</i> .....	28
FIGURA 5 – ELETROFORE EM GEL DE AGAROSE DOS CLONES DO FRAGMENTO 1 E FRAGMENTO 2 .....	29
FIGURA 6 – ELETROFORE EM GEL DE AGAROSE DOS CLONES DE <i>mucR</i> Del EM pUC19 .....	30
FIGURA 7 – ELETROFORE EM GEL DE AGAROSE DOS CLONES DE <i>mucR</i> Del EM pK18mobsacB. ....	31
FIGURA 8 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM OS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS RESULTANTE DA PCR COM OS PRIMERS <i>pmucR</i> for E <i>dmucR</i> 4 .....	32
FIGURA 9 – REGIÃO GENÔMICA DE INSCERÇÃO DOS GENES E PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS PARA DELEÇÃO DO GENE <i>y4aO</i> . ....	33

FIGURA 10 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM FRAGMENTO AMPLIFICADO RESULTANTE DA PCR COM OS PRIMERS psyrUP E dhypO .....	33
--	----

FIGURA 11 – ELETROFORE EM GEL DE AGAROSE DOS CLONES DE pTZ57R/T-hypO1b .....	34
--	----

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 – ESTIRPES E PLASMÍDEOS – 2018 ..... 19

TABELA 2 – SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES  
(PRIMERS) UTILIZADOS..... 24



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	CONTEXTO E PROBLEMA .....	11
1.2	OBJETIVOS .....	12
1.2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	12
1.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
2.1	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO .....	13
2.2	RIZÓBIOS .....	14
2.3	<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 .....	14
2.4	Genes <i>sydB</i> , <i>mucR</i> e <i>y4aO</i> .....	16
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	19
3.1	ESTIRPES E PLASMÍDEOS .....	19
3.2	CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	20
3.3	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE .....	20
3.4	PREPARO PARA CÉLULAS TERMOCOMPETENTES .....	21
3.5	TRANSFORMAÇÃO ATRAVÉS DE CHOQUE TÉRMICO .....	21
3.6	EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL .....	21
3.7	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	22
3.8	RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA .....	22
3.9	REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	22
3.10	TRATAMENTO COM FOSFATASE ALCALINA .....	23
3.11	REAÇÃO DE LIGAÇÃO.....	23
3.12	OBTENÇÃO DAS CONSTRUÇÕES COM DELEÇÃO EM FASE .....	23
3.13	OBTENÇÃO DE ESTIRPES MUTANTES DE <i>S. fredii</i> NGR234 .....	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
4.1	OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS PARA CONSTRUÇÃO DO <i>mucR</i> /Del PARA DELEÇÃO EM FASE POR DUPLA RECOMBINAÇÃO COM NGR23426	
4.1.1	OBTENÇÃO DOS CONJUGANTES DE <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 COM O PLASMÍDEO pK18- <i>mucR</i> /Del.....	31
4.2	OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS PARA CONSTRUÇÃO DO <i>y4aO</i> /Del	

PARA DELEÇÃO EM FASE POR DUPLA RECOMBINAÇÃO COM  
NGR23432

5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
	REFERÊNCIAS.....	36

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CONTEXTO E PROBLEMA

Diazotrofos são um grupo de microrganismos capazes de utilizar o nitrogênio atmosférico (dinitrogênio) para produzir compostos nitrogenados assimiláveis por plantas e animais. Nitrogênio é a base da vida, estando presente em várias biomoléculas como as bases nitrogenadas do DNA e aminoácidos das proteínas. Um conjunto de genes produz as proteínas necessárias para atuação da nitrogenase capaz de quebrar as ligações do dinitrogênio. Além da nitrogenase, outras proteínas estão envolvidas na catalisação da conversão de  $N_2$  até suas formas assimiláveis como amônia. O processo de fixação biológica de nitrogênio tem grande importância econômica, uma vez que a fixação do nitrogênio no solo torna esse elemento bio disponível para os organismos que não são capazes de usar o nitrogênio atmosférico.

Os rizóbios estão entre os microrganismos com a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e são encontrados em sua forma livre no solo e ou em simbiose com plantas leguminosas. Quando em simbiose eles podem ser encontrados dentro de nódulos, órgãos criados pela própria planta para os microrganismos conseguirem se manter e realizar a fixação de nitrogênio de forma eficaz. O processo de simbiose exige um diálogo por meio de sinais moleculares altamente específicos entre as plantas hospedeiras e essas bactérias. Os primeiros sinais são dados por flavonoides que são liberados pelas raízes das plantas, isso atrai as bactérias até a região da rizosfera. Os flavonoides também são responsáveis por induzirem a transcrição dos genes de cujos produtos são responsáveis pela síntese dos fatores Nod. Com as trocas dos sinais, o processo de nodulação se inicia e a planta curva um pelo radicular sobre o rizóbio começando o processo de englobamento. A bactéria forma o cordão de infecção e inicia a divisão celular cortical. Depois da infecção, a bactéria assume uma forma diferente, denominada bacteroide, que só encontrada nesta endossimbiose e é capaz de fixar nitrogênio atmosférico.

Essa capacidade de fixação de nitrogênio e interação com plantas leguminosas faz dos rizóbios organismos de grande importância para agricultura como uma forma de substituir os compostos nitrogenados de origem industrial para adubação de plantações. Esses compostos são formados através de métodos poluentes e com elevados gastos de energia, enquanto o uso de organismos

diazotrofos pode substituir quase que 100% de toda a contribuição de nitrogênio proveniente de fertilizantes químicos.

*Sinorhizobium fredii* NGR234 é uma das bactérias com maior capacidade de nodulação de diferentes hospedeiros. Apenas no grupo das leguminosas foram registrados mais de 112 gêneros que podem ser nodulados por esta bactéria. Entre estes estão plantas que tem grande importância econômica como *Phaseolus vulgaris* (feijão) entre outras leguminosas, devido a produção de grãos ricos em proteínas.

Em seu plasmídeo simbiótico, *S. fredii* NGR234 tem os genes codificantes para reguladores de transcrição da família LysR: NodD1, NodD2, SyrM1 e SyrM2 que estão diretamente envolvidos com na regulação da nodulação. O objetivo deste trabalho é a obtenção de mutantes nos genes *mucR* (NGR\_a00320) e *y4aO* (NGR\_a00330) que estão presentes em um provável operon em conjunto com os genes *nodD1* e *syrB*, possivelmente tendo relação com o processo de interação das bactérias com as plantas. A deleção desses genes pode ajudar a elucidar o processo de nodulação e explicar esta possível interação com os demais genes próximos.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho é analisar a função dos genes *mucR* e *y4aO* de *S. fredii* NGR234 através da obtenção de estirpes mutantes e análise fenotípica resultante.

### 1.2.2 Objetivos específicos

Amplificar, clonar e sequenciar os fragmentos iniciais e finais dos genes *mucR* e *y4aO* de *S. fredii* NGR234;

Obter as construções *mucR/Del* e *y4aO/Del* com deleção em fase de parte da sequência destes genes;

Obtenção das estirpes mutantes de *S. fredii* NGR234 com deleção dos genes *mucR* e *y4aO*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

O nitrogênio é um dos três elementos mais abundantes dentro da matéria viva nos organismos, sendo eles o nitrogênio, carbono e hidrogênio tendo papel fundamental na formação das moléculas estruturais como os ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e outras moléculas importantes para constituição dos seres vivos. Sua grande importância faz do nitrogênio um fator limitante de crescimento dos vegetais, uma vez que no ambiente, sua forma mais estável encontrada normalmente é como dinitrogênio, uma molécula altamente estável e em estado gasoso na temperatura ambiente, por isso não está biodisponível e que constitui aproximadamente 80% do gás da atmosfera (SANTI et al., 2013). Para se tornar disponível para a maioria dos seres vivos é necessário ocorrer o processo conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN). Este processo é realizado por microrganismos capazes de reduzir o dinitrogênio a amônia, através do complexo enzimático nitrogenase (SMITH, 2002).

Os diazótrofos, como são conhecidas as bactérias capazes de converter nitrogênio atmosférico a outros compostos nitrogenados, podem ser encontrados em sua forma livre no solo (ambiente) ou em interação com as plantas, sendo que alguns podem ser simbióticos e viver em associação com as plantas de forma bem específica. Algumas leguminosas, a partir da interação com esses procariotos podem criar estruturas específicas para o estabelecimento dessas culturas de bactérias conhecidas como nódulos. Os nódulos quando maduros criam um ambiente quase anóxico devido a presença de leghemoglobina, possibilitando a função da nitrogenase (DENARIE et al., 1992).

O uso de fertilizantes nitrogenados através de fixação químico-física corresponde a mais de 1% de toda energia gasta no planeta, para a sua produção, além de utilizar recursos derivados do petróleo que são de origem não renovável, tornando-se uma produção poluente e de alto custo (SMITH, 2002). O petróleo é usado para obtenção do gás hidrogênio necessário para redução do nitrogênio, são utilizados catalizadores feitos à base de ferro, temperatura e pressão necessária são elevadas acima dos 600°C e 800atm (HUNGRIA et al, 1997). Os fertilizantes de origem químico-física são usados indiscriminadamente para aumentar a produção nos

cultivares, não tendo total absorção pela planta, sendo que uma taxa de 50% do nitrogênio químico é absorvido e o restante é convertido a formas inorgânicas ou lixiviado do solo. Esse processo de lixiviação tende a sofrer acumulação em ambientes aquáticos e causar toxicidade e eutrofização dos ambientes (HUNGRIA et al., 2001). Ainda assim, os fertilizantes químicos são usados em grande quantidade, muitas vezes em excesso, pois a falta de nitrogênio de forma assimilável é um fator limitante da produção de alimentos por todo o mundo.

## 2.2 RIZÓBIOS

As bactérias chamadas de rizóbios pertencem à família Rhizobiaceae, possuem o complexo enzimático da nitrogenase e a capacidade de simbiose com plantas que pertencem ao grupo das leguminosas. O grupo dos rizóbios abrange cinco gêneros de bactérias, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium* (GEURTS; BISSELING, 2005).

A fixação de nitrogênio pelos diazotrofos em cultivares de leguminosas pode chegar ao dobro de nitrogênio absorvido por meio de adição de fertilizantes industriais uma vez que a biodisponibilidade pela interação planta bactéria acontece diretamente dentro da planta. Em alguns cultivares inoculados com certas estirpes de microrganismos a necessidade de nitrogênio são totalmente supridas pela fixação biológica (DOBEREINER et al., 2000). O processo de interação planta-bactéria exige uma relação simbiótica de alta complexidade que permita o sucesso da infecção e a formação de nódulos sem reações de defesa desencadeados pela planta hospedeira. As substâncias que sinalizam aos microrganismos a presença das plantas no solo são carboidratos, ácidos orgânicos, vitaminas, aminoácidos e compostos fenólicos liberados dentro da rizosfera da planta. Os flavonoides são os principais fatores que sinalizam aos diazotrofos e iniciam a resposta ao início de interação planta-bactéria (PERRET et al., 2000). Estes compostos são detectados por proteínas como NodD que ativam a transcrição de grupos de genes como *nod*, *noe* e *nol*. Os produtos destes genes são responsáveis pela síntese dos fatores Nod, responsáveis por uma das primeiras etapas do processo de nodulação.

## 2.3 *Sinorhizobium fredii* NGR234

*Sinorhizobium fredii* NGR234 é um diazotrofo de amplo espectro hospedeiro, capaz de nodular 112 gêneros de leguminosas e a não leguminosa *Parasponia andersonii* (PUEPPKE AND BROUGHTON, 1999). Segundo SCHMEISSER et al., (2009) sua capacidade de nodulação se dá pela quantidade de genes envolvidos em sistemas de secreção que esse organismo possui. O genoma do *S. fredii* NGR234 é dividido em 3 replicons: um cromossomo, um megaplasmídeo e o plasmídeo simbiótico. O cromossomo é capaz de codificar quase todas as proteínas envolvidas no metabolismo celular basal desse organismo, possui 3,93Mpb (Milhões de pares de base) e é chamado de cNGR234. O *S. fredii* NGR234 conta com mais 2 plasmídeos, o primeiro um megaplasmídeo com 2,43Mpb, o pNGR234b, que contem boa parte dos genes que codificam os genes de polissacarídeos de membrana e de transportadores, e alguns genes do metabolismo basal também. O último replicon é um plasmídeo responsável quase que exclusivamente pela capacidade de simbiose do rizóbio com as plantas vasculares, o pNGR234a. Com 0,54Mpb, este plasmídeo possui uma quantidade menor de genes, nenhum dos genes codificam funções essenciais a vida do organismo de forma livre e as maiores dos genes conhecidos por nodulação e reconhecimento simbiótico estão nesse plasmídeo.

O processo de nodulação por *Sinorhizobium fredii* NGR234 tem início quando os microrganismos identificam flavonoides na rizosfera das plantas que interagem com a proteína NodD1. A proteína NodD1, quando na presença de flavonoides de plantas hospedeiras, atua como ativadora de transcrição de genes e operons envolvidos na cascata de nodulação (PERRET et al., 1999).

NodD1 também induz a transcrição dos genes *ttsI* e *syrM2*, os quais codificam para os fatores de transcrição TtsI e SyrM2 (KOBAYASHI et al., 2008). A proteína SyrM2 regula a expressão de *syr*-boxes que se encontram no plasmídeo simbiótico (KOBAYASHI et al., 2004). Entre os alvos de regulação de SyrM2 encontra-se o homólogo de NodD1, NodD2, que age na ativação de certos *nod*-boxes de ação tardia no processo de nodulação. NodD2 também reprime a expressão de NodD1 e dos genes envolvidos na síntese de fatores Nod, participando assim do ajuste da cascata regulatória (KOBAYASHI et al., 2008). As proteínas NodD1 e NodD2 de *S. fredii* NGR234 regulam um total de 18 promotores que apresentam sequências conservadas chamadas de *nod*-box. O regulador TtsI ativa a transcrição de genes que possuem sequências conservadas ou *tts*-boxes. Entre os produtos destes genes estão os componentes do T3SS (Sistema de secreção do tipo 3) e as proteínas secretadas

por este sistema: NopL, NopT, NopJ, NopM e NopP (MARIE et al., 2003; BARTSEV et al., 2004; KAMBARA et al., 2009). A estrutura do T3SS atravessa a bicamada lipídica da bactéria, a parede e membrana plasmática vegetal, e injeta as proteínas efetoras diretamente no citoplasma da planta.

## 2.4 Genes *syrB*, *mucR* e *y4aO*

Os genes *syrB*, *mucR* e *y4aO* de *Sinorhizobium fredii* NGR234 estão localizados próximos ao gene *nodD1* no plasmídeo simbiótico. As funções dos produtos destes genes não foram bem elucidadas neste organismo e não se sabe os possíveis efeitos na cascata regulatória de nodulação em plantas. A deleção desses genes pode ajudar a explicar essas funções em NGR234.

O gene *syrB* foi descrito pela primeira vez em 1997 por Barnett e Long em *Sinorhizobium meliloti*, uma bactéria diazotrófica capaz de se associar com algumas plantas leguminosas. A proteína produto do gene *syrB* está ligada com a repressão da expressão da proteína SyrM, mas não se sabe exatamente como essa repressão funciona. A expressão de *syrM* está associado a cascata de síntese dos fatores Nod e a produção de polissacarídeos de exposição da bactéria e reconhecimento pela planta (BARNETT; LONG, 1997).

O gene *syrB* de *S. fredii* NGR234 se mostrou como um intermediador durante a conversa molecular entre os diferentes tipos de plantas e bactérias (LEITE, 2014). A deleção deste gene provoca uma melhor capacidade de nodulação nas plantas *Macroptilium atropurpureum*, *Vigna unguiculata* e *Tephrosia vogelli* enquanto que para *Crotalaria juncea* a ausência de *syrB* teve efeito negativo na nodulação (LEITE, 2014).

A proteína MucR também possui função pouco conhecida. Em *Sinorhizobium meliloti*, o produto do gene *mucR*, está envolvido na regulação da transcrição de genes da síntese de exopolissacarídeos (EPS). Alguns destes EPS são essenciais para o processo de nodulação de *S. meliloti* (KELLER, et al. 1995).

O produto do gene *y4aO* está anotado no genoma de *S. fredii* NGR234 como proteína hipotética e sua função não é conhecida. Através de análises entre genomas, o gene *y4aO* parece não estar presente em bactérias semelhantes.

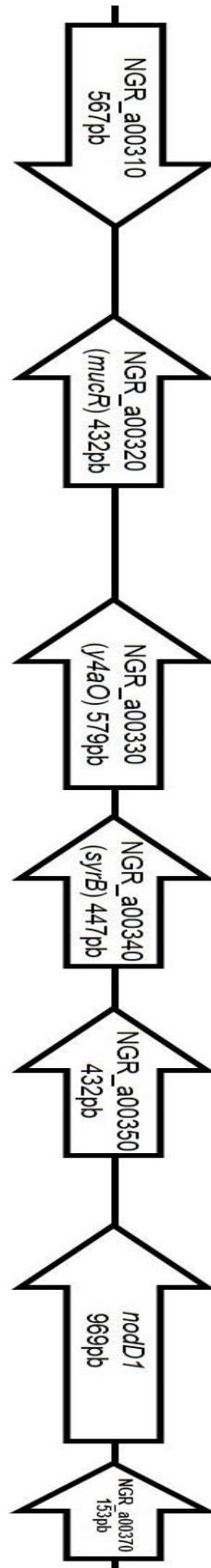
A posição dos genes *syrB*, *mucR* e *y4aO* no genoma de *S. fredii* NGR234 sugere que eles podem apresentar funções relacionadas. Estes estão na mesma direção do gene *nodD1*, podendo compor um único operon como representado na



**FIGURA 1.**

Uma forma de avaliar a função gênica é a obtenção de estirpes mutantes nos genes alvo e análise fenotípica destes mutantes. Quando os genes estão organizados em um operon, ou neste caso, um provável operon, mutações por inserção podem resultar em efeito polar, ou seja, a interrupção em um gene pode modificar o padrão de expressão dos genes a jusante. Desta forma, as estirpes mutantes deste projeto serão obtidas por deleção em fase. O resultado final será um gene com a maior parte da sua sequência deletada, mas sem nenhum prejuízo à organização transcricional dos genes vizinhos.

FIGURA 1 – POSIÇÃO DOS GENES *syrB*, *mucR* E *y4aO* EM *S. fredii* NGR234.



FONTE: O Autor 2018

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ESTIRPES E PLASMÍDEOS

TABELA 1 – ESTIRPES DE BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

ESTIRPE OU PLASMÍDEO	GENÓTIPO / FENÓTIPO	REFERÊNCIA
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F-mrcA $\Delta\Phi80d$ lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 <i>endA1 recA1 deoR</i> $\Delta((ra,leu)7697 araD139 galU galK$ <i>nupG rpsL -<math>\lambda</math></i>	INVITROGEN
<i>Escherichia coli</i> S17.1	<i>tmp<sup>R</sup>, spc<sup>R</sup>, str<sup>R</sup>, rec<sup>A</sup>, pro, hsd<sup>R</sup>,</i> RP4-2-Tc::Mu - Km::Tn7	SIMON <i>et al.</i> , 1983
<i>Sinorhizobium</i> <i>fredii</i> NGR234	Rif <sup>R</sup> derivado do tipo selvagem de NGR234	TRINICK, 1980
<i>Sinorhizobium</i> <i>fredii</i> NGR234/pK18- mucR/Del pTZ57R/T	Rif <sup>R</sup> derivado do tipo selvagem de NGR234 com recombinação com plasmídeo pK18-mucR/Del Amp <sup>R</sup> , Vetor de clonagem metodo T/A	ESTE TRABALHO  FERMENTAS
pK18mobsacB	Km <sup>R</sup> , <i>sacB</i> , <i>lacZa</i> , Vetor de clonagem que permite a seleção de duplo recombinante	SCHAFER <i>et al.</i> , 1994
pDK6	Km <sup>R</sup> , vetor de clonagem	KLEINER <i>et al.</i> , 1998
pUC19	Vetor de clonagem. Amp <sup>R</sup>	THERMO FISCHER SCIENTIFIC
pUC19-mucR1	Vetor de clonagem com resistência Amp <sup>R</sup> , contendo parte do gene <i>mucR</i> .	DAYANE DA SILVA CERQUEIRA LEITE
pTZ57R/T-mucR2	Vetor de clonagem com resistência Amp <sup>R</sup> , contendo parte do gene <i>mucR</i> .	ESTE TRABALHO

pUC19-mucR/Del	Vetor de clonagem com resistência Amp <sup>R</sup> , contendo cassete para deleção em fase através de dupla recombinação com estirpe mutante.	ESTE TRABALHO
pK18-mucR/Del	Km <sup>R</sup> , <i>sacB</i> , <i>lacZa</i> , Vetor de clonagem que permite a seleção de duplo recombinante com inserção do cassete <i>mucR/Del</i>	ESTE TRABALHO
pTZ57R/T-hypO1b	Vetor de clonagem com resistência Amp <sup>R</sup> , contendo parte do gene <i>y4aO</i> .	ESTE TRABALHO

---

FONTE: O Autor 2018.

### 3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas a 37°C nos meios Luria Bertani (LB) e Luria Bertani Agar (LA) (SAMBROOK et al., 1989). As estirpes de *S. fredii* NGR234 foram cultivados em 28°C em meio triptona-levedura (TY) (BERINGER., 1974). Além dos meios, para seleção de estirpes e plasmídeos específicos foram adicionados antibióticos rifampicina (Rif) 50-100 µg/mL (para cultivo de NGR234), canamicina (Km) 50 µg/mL e Ampicilina (Amp) 250 µg/mL (para cultivo de *E. coli*, de acordo com o plasmídeo usado), além da adição de sacarose 2% para seleção de duplos recombinantes.

### 3.3 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A avaliação de amostras de DNA plasmidial e DNA cromossomal foi realizada através de eletroforese em gel de agarose e tampão TBE 1x (Tris 90 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM). Para visualização das amostras foi utilizada coloração com banho do gel em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL e transiluminador de luz UV (ultravioleta) e foto documentador acoplado (Cell biosciences).

### 3.4 PREPARO PARA CÉLULAS TERMOCOMPETENTES

Um pré-inóculo de células de *E. coli* correspondente a cada estirpe necessária foi feito em 3 mL de meio LB. Após 12 horas, 500 µL dessa cultura foram usados para um novo inóculo em 80 mL de meio LB e novamente mantido em incubação até atingir uma D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 0,4. A cultura foi distribuída em tubos estéreis para centrifuga e mantido em banho de gelo por 10 minutos antes do procedimento. As células foram submetidas a centrifuga a 5000 rpm a uma temperatura de 4°C por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 15 mL de solução MgCl<sub>2</sub> 100 mM estéril sob refrigeração. A mistura foi novamente centrifugada, descartado o sobrenadante e o *pellet* de células foi ressuspendido em uma solução de CaCl<sub>2</sub> 100 mM com volume de 25 mL e mantido em banho de gelo por 30 minutos. Novamente a cultura foi centrifugada e o sobrenadante descartado, as células ressuspensas em 800 µL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM com 20% de glicerol serão armazenadas em alíquotas de 100 µL a -80°C.

### 3.5 TRANSFORMAÇÃO ATRAVÉS DE CHOQUE TÉRMICO

Células termo competentes mantidas a -80°C, descongeladas dentro de banho de gelo, foram misturadas com 500 ng de DNA plasmidial purificado para serem transformadas. A suspensão mantida em gelo por 20 minutos foi submetida ao choque térmico a 42°C em bancada térmica por 2 minutos e transferido novamente ao gelo por mais 2 minutos, adição de 400 µL de meio LB e levado a estufa a 37°C por 1 hora para recuperação das células. A seleção foi feita em placas com meio LA e antibióticos específicos do plasmídeo, mantidas em estufa 37°C por 24 horas.

### 3.6 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Culturas de *E. coli* cultivadas em meio LB foram centrifugadas a 14.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* dissolvido em de 150 µL de GET (glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris HCL pH 8,0 25 mM). As células foram lisadas com solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,18 M). Em seguida foram adicionados 150 µL de Acetato de potássio 3 M, ácido fórmico 1,8 M, pH 4,8 misturado por inversão e mantido em banho de gelo por 10 minutos e 50 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1).

Após centrifugação o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e o DNA precipitado com etanol absoluto na proporção de 3x o volume de etanol do volume original de sobrenadante obtido. Após uma etapa de lavagem do DNA plasmidial com etanol 80%, o DNA seco foi dissolvido e hidratado em 15 µL de água ultrapura.

### 3.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As misturas para reações de PCR foram obtidas pela adição de MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, solução de dNTPs 5 nmol, 10 pmol de cada primer, TAQ DNA polimerase e 200 ng de molde de DNA ao tampão apropriado. O programa utilizado possui uma etapa inicial de desnaturação da dupla fita a 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56 a 64°C por 30 segundos dependendo dos primers utilizados a temperatura muda e 72°C por 45-150 segundos, e uma etapa final de extensão a 72°C por 3 minutos.

### 3.8 RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA

Amostras de DNA foram tratadas com enzimas de restrição para separação, ligação e confirmação dos fragmentos desejados de DNA. Cada mix de reação de restrição continha 1-2µL do respectivo tampão apropriado para enzima, 0,5 µL de DNA em concentração adequada, 0,5µL de RNase, 0,2µL de enzima de restrição e volume ajustado com água ultrapura estéril para 10 µL. As reações foram incubadas a 37°C por 3 horas e inativadas a 80°C por 20 minutos.

### 3.9 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Amostras de DNA plasmidiais contendo os fragmentos a ser sequenciados foram previamente tratadas com RNase, o DNA foi diluído em 50 µL de água ultrapura e adicionado 2 µL de RNase incubado a 37°C. Após 3 horas o DNA foi precipitado e concentrado novamente. Reações de sequenciamento com um volume total de 10µL, continham 2 µL de tampão Big Dye, 0,8 µL de solução BigDye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific), 0,6 µL de primer Universal ou Reverso, 1-6,6 µL de DNA dependendo da concentração da amostra e volume final ajustado se necessário com água ultrapura auto clavada. O programa utilizado no termociclador continha uma

etapa inicial de 95°C para desnaturação das fitas de DNA por 2 minutos, seguidos de 34 ciclos de: 95°C por 15 segundos para desnaturação, 50°C por 15 segundos para anelamento dos primers, 60°C por 2 minutos para extensão da cadeia de DNA pela TAQ DNA polimerase. Após o termino do programa, as amostras foram acrescidas de 10 µL de água ultrapura e 2 µL de acetato de amônio 7,5 M. A mistura foi transferida para tubos de 0,5 µL e adicionados 100 µL de etanol absoluto, centrifugado a 14.500 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500 µL de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante a amostra foi deixada para secar em estufa a 40°C no escuro ou overnight sem contato com luz. O sequenciador utilizado foi ABI3500 (Applied Biosystems).

### 3.10 TRATAMENTO COM FOSFATASE ALCALINA

Nos processos de clonagem, o DNA dos vetores foi tratado com a enzima fosfatase alcalina para evitar a ligação das pontas do próprio vetor. Após digestão enzimática, as enzimas foram inativadas por 20 minutos a 80°C. Foi adicionado de 1 µL de Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) para cada 5 µL de DNA utilizado para a digestão inicial, incubado a 37°C por 3 horas e inativado a 60°C por 20 minutos. O DNA foi precipitado com Etanol Absoluto, centrifugado por 10 minutos a 14.500rpm e lavado com 500 µL etanol 80%. Após nova centrifugação a 14.500 por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi seco em temperatura ambiente e posteriormente hidratado com água ultrapura.

### 3.11 REAÇÃO DE LIGAÇÃO

Produtos obtidos por PCR ou por estrição enzimática foram submetidos juntamente aos plasmídeos (vetores) também tratados com as enzimas para receberem os DNA insertos a um sistema de ligação. As reações continham 2 µL de tampão para DNA ligase 5x, 0,5 µL de enzima T4 DNA Ligase, aproximadamente 25 ng de DNA vetor, 5 a 7 µL de DNA inserto. O volume final foi ajustado para 10 µL e incubado overnight em temperatura ambiente.

### 3.12 OBTENÇÃO DAS CONSTRUÇÕES COM DELEÇÃO EM FASE

A estratégia para a obtenção dos mutantes envolve a utilização de pares de primers que amplificam as regiões inicial e final dos genes de interesse. Estes segmentos são ligados criando uma versão truncada dos genes. As sequências dos primers utilizados estão listadas na Tabela 2.

Em um trabalho anterior, a região inicial do gene *mucR* foi amplificada usando os primers pmucR for e pmucR rev. O fragmento obtido continha 550pb e foi clonado no plasmídeo pUC19 dando origem ao plasmídeo puc19-mucR1 (Leite, 2014).

TABELA 2 – SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (PRIMERS) UTILIZADOS.

PRIMERS	Oligonucleotídeos iniciadores
phypO	5' ATCAAGAGCTCCGGCATATCG 3'
dhypO	3' ATCTCGCAAGCTTTCCAGGAC 5'
pmucR for	5' AAGCTTAATGACGATGTCTG 3'
pmucR ver	5' GTCGACCGTGGTTTCTGTCT 3'
dmucR 3	5' CGTCGACCCAAGGAGARAGGGC 3'
dmucR 4	5' GGATCCGGCCAAGCTATGCA 3'
psyrB up	5' GGATCCCAGAATATGTCCCA 3'

FONTE: O autor 2018.

Neste trabalho, o segundo fragmento do gene *mucR* foi amplificado usando os primers dmucR 3 e dmucR 4 e contém a porção final do gene com um total de 659 pb. Este fragmento foi clonado no vetor pTZ57 e o inserto sequenciado para confirmar a integridade da sequência.

Após a amplificação e clonagem dos fragmentos, eles foram ligados para obtenção do gene truncado, que foi inserido em um vetor contendo dupla seleção. Essa construção foi inserida em células s17.1 de *E. coli* que serão utilizadas para conjugação.

Para o gene *y4aO* foi utilizado o mesmo fragmento obtido pelo par de primers pmucR for e pmucR rev de 550 pb, pois este fragmento contém a região final do gene *y4aO*. O fragmento contendo a região inicial do gene foi amplificado utilizando os primers psyrB up e dhypO gerando um fragmento com 1100 pb. Os fragmentos clonados foram digeridos e extraídos e foram ligados diretamente no vetor



pK18mobsacB através dos sítios criados nos primers.

### 3.13 OBTENÇÃO DE ESTIRPES MUTANTES DE *S. fredii* NGR234

As estirpes mutantes foram obtidas através da recombinação entre as construções com as deleções em fase e o genoma de *S. fredii* NGR234. Para tanto, o plasmídeo contendo a construção mucR/Del foi transformada em células da estirpe S.17 de *E. coli*.

Para a conjugação de estirpes de *E. coli* com *S. fredii* NGR234, as culturas de interesse foram crescidas separadamente em meio sólido. Após crescimento das colônias, as células foram misturadas em uma placa contendo uma mistura dos meios de cultura utilizados para o crescimento das duas bactérias sem adição de antibióticos e mantidas por 24 horas em estufa a 28°C.

A massa de células resultante desta mistura foi diluída em meio TY líquido, sendo 1cm<sup>2</sup> de massa para cada 800 µL de meio. As células foram distribuídas em placas com meio sólido TY contendo rifampicina 100 mg/mL e canamicina 50 mg/mL e deixadas em estufa 28°C por 48 a 72 horas. As colônias obtidas foram avaliadas através de PCR com os primers pmucR for e dmucR4 que amplificam tanto a região completa do gene selvagem um fragmento de 1600 pb e ao gene truncado um fragmento de 1197 pb.

Para as reações de PCR utilizando as colônias prováveis para teste, foi feito uma extração de DNA por fervura a 100°C de uma mistura de massa de células com água ultrapura por 10 minutos. Após centrifugação por 3 minutos a 14.500 rpm foram utilizados 2 µL do sobrenadante para cada sistema de 10 µL de PCR.

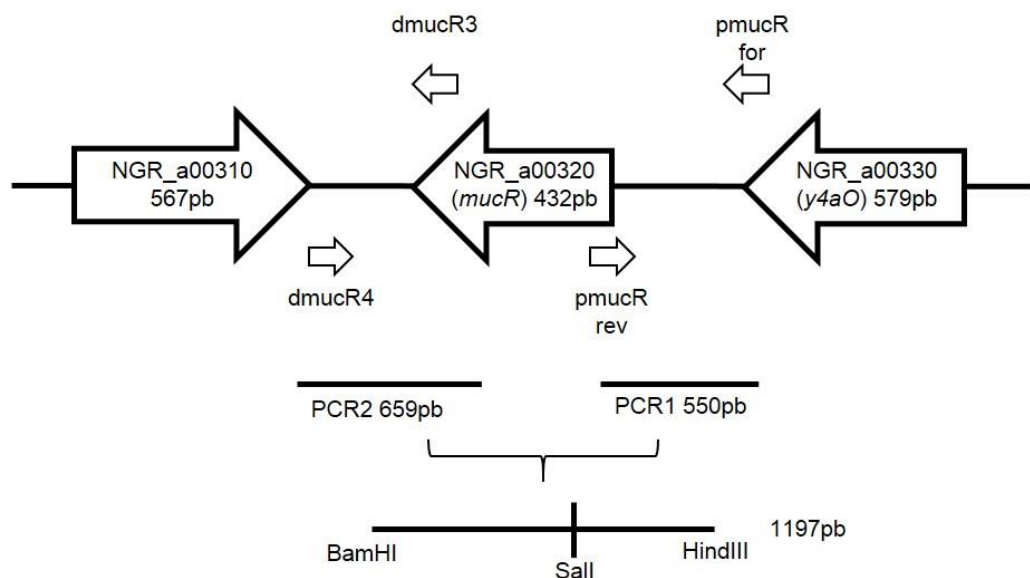
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os genes *mucR* e *ya4O* estão localizados no plasmídeo simbiótico de *Sinorhizobium fredii* NGR234 e estão próximos ao gene *nodD1*, que é o principal regulador do processo de nodulação deste organismo. A forma como estes genes estão organizados no genoma sugere que possam fazer parte de um mesmo operon e possivelmente apresentar funções relacionadas. Mutantes contendo as deleções desses genes em fase tem como objetivo estudar o processo de nodulação e regulação dos genes que participam da nodulação em *S. fredii* NGR234.

### 4.1 OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS PARA CONSTRUÇÃO DO *mucR*/Del PARA DELEÇÃO EM FASE POR DUPLA RECOMBINAÇÃO COM NGR234

A porção genômica correspondente ao gene *mucR* onde os primers foram construídos, entre os dois primers mais espaçados, pmucR for e dmucR 4, corresponde a um fragmento de 1565pb. Os fragmentos juntos para compor o fragmento para deleção contam com 1197pb (FIGURA 2).

FIGURA 2 – REGIÃO GENÔMICA DE INSERÇÃO DOS GENES E PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS PARA DELEÇÃO DO GENE *mucR*.

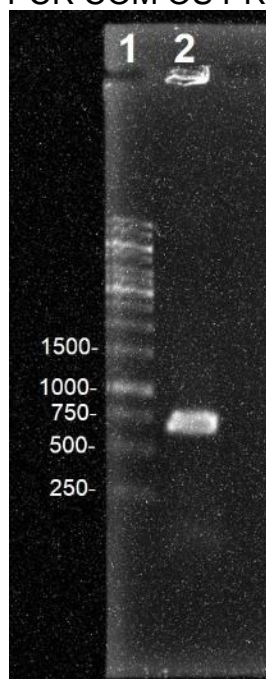


FONTE: O autor (2018).

Através de uma PCR utilizando como molde DNA genômico extraído de *S. fredii* NGR234 com o par de primers pmucR for e pmucR rev foi obtido um fragmento de 550pb denominado (Fragmento 1(PCR1)) que foi inserido no plasmídeo pUC19 digerido com a enzima *Sma*I. Este fragmento foi obtido e sequenciado em um projeto anterior no LIPB (LEITE, comunicação pessoal) produzindo o plasmídeo puc19-mucR1.

No presente trabalho, utilizando os primers dmucR3 e dmucR4 sobre o DNA genômico do NGR234, foi obtido o fragmento de 659 pb denominado (Fragmento 2 (PCR2)) (FIGURA 3).

FIGURA 3 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM FRAGMENTO AMPLIFICADO RESULTANTE DA PCR COM OS PRIMERS dmucR 3 E dmucR 4.



LINHA 1 – Marcador 1 Kb DNA ladder; LINHA 2 – Fragmento com 659pb.  
FONTE: O autor (2018).

Este fragmento foi inserido no plasmídeo pTZ57R/T e transformado em células DH10B. O DNA das colônias selecionadas foi extraído e analisado para confirmação da clonagem através da digestão do DNA plasmidial com as enzimas *Eco*RI e *Xba*I liberando o fragmento inserido (FIGURA 4) e o plasmídeo foi denominado pTZ57R/T-mucR2. O fragmento contido neste plasmídeo foi sequenciado para verificar a ausência de mutações.

FIGURA 4 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM pTZ57R/T-mucR2 DIGERIDO COM *EcoRI* E *XbaI*.

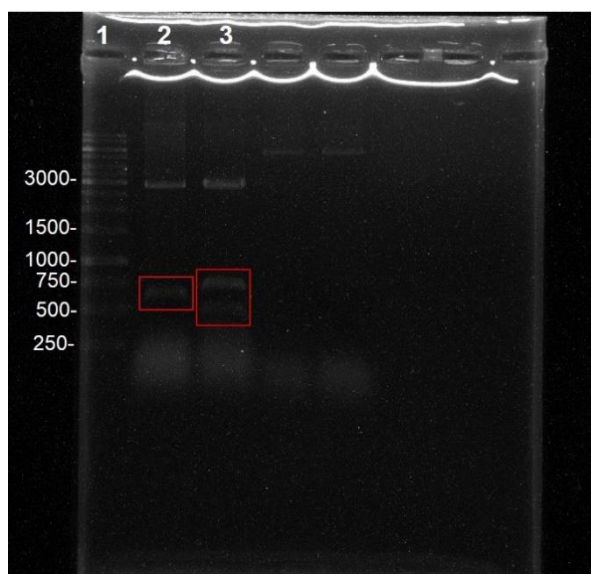


LINHA 1 – Marcador 1 Kb DNA ladder; LINHA 2, 3 E 4 – pTZ57R/T-mucR2 DIGERIDO POR *EcoRI* E *XbaI* COM FRAGMENTO ESPERADO DE 650pb.  
FONTE: O autor (2018).

Com os fragmentos clonados foram realizadas as digestões com as enzimas *Bam*HI e *Sal*I no pTZ57R/T-*mucR2* para liberar o fragmento 2 de 659 pb e pUC19-*mucR1* digerido por *Sal*I e *Hind*III com fragmento esperado de 550 pb. Devido a uma duplicação do sítio *Sal*I dentro da sequência do fragmento no clone, a digestão resultava em 2 fragmentos de tamanhos diferentes sendo o esperado de 659 pb e um fragmento de 450 pb (FIGURA 5).

Para obtenção do fragmento de interesse uma digestão parcial do pTZ57R/T-*mucR2* com as enzimas *Sal*I e *Bam*HI foi realizada. Utilizando o Kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) foi extraído o fragmento de interesse do gel de agarose. O fragmento de interesse foi inserido no vetor pUC19-*mucR1* que foi digerido utilizando as mesmas enzimas do corte do fragmento 2, *Sal*I e *Bam*HI. Antes da ligação, o vetor foi tratado com a enzima fosfatase alcalina de camarão para evitar que o fechamento entre suas pontas. A reação de ligação foi transformada em células de linhagem DH10B de *E. coli*.

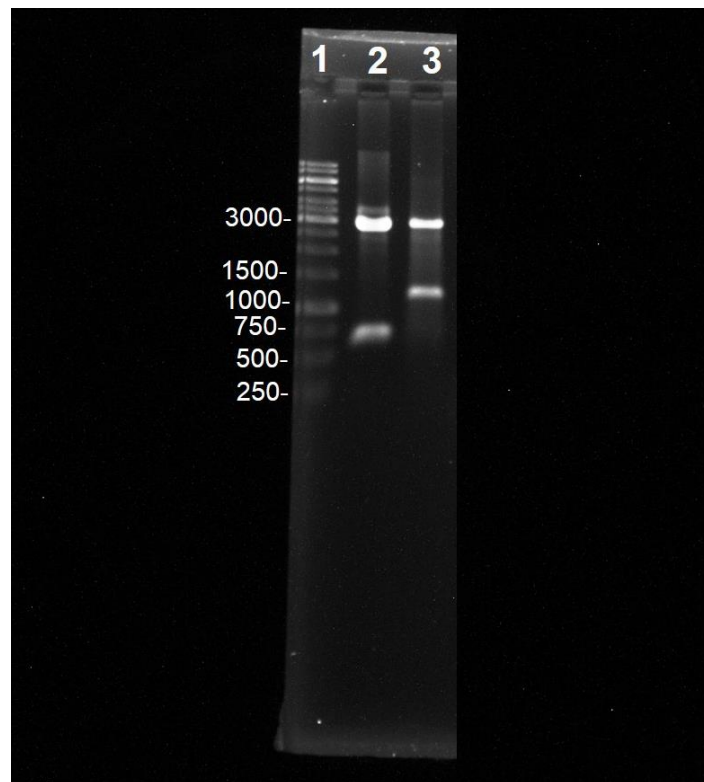
FIGURA 5 – ELETROFORE EM GEL DE AGAROSE DOS CLONES DO FRAGMENTO 1 E FRAGMENTO 2.



LINHA 1 – Marcador 1 Kb DNA ladder; LINHA 2 – pUC19-mucR1 DIGERIDO POR *SalI* E *HindIII* COM FRAGMENTO ESPERADO DE 550 pb; LINHA 3 - pTZ57R/T-mucR2 DIGERIDO COM *BamHI* e *SalI* PARCIALMENTE COM OBTENÇÃO DOS 2 FRAGMENTOS DE 659 pb e 450 pb.  
FONTE: O autor (2018).

A confirmação dos clones que continham os 2 fragmentos ligados dentro do vetor pUC19, foi feita por extração de DNA plasmidial das colônias e restrição dos plasmídeos com as enzimas *BamHI* e *HindIII* para liberação do fragmento de interesse de 1197 pb. No entanto, uma análise *in silico* mostrou um sítio duplicado de *HindIII* dentro do Fragmento 2, o que geraria dois fragmentos após a restrição, um de 450 pb e outro de 750 pb. Através de um estudo das sequências dos fragmentos e do vetor em que estavam inseridos foram escolhidas novas enzimas para liberar os fragmentos juntos. A enzima *EcoRI*, presente no sítio de policlonagem do vetor, foi escolhida por ter corte único, e juntamente com o sítio da enzima *BamHI* do fragmento, liberam um fragmento com entorno de 1260 pb, que contém os fragmentos utilizados para criar o fragmento mucR/Del de 1197 pb e mais uma região de mais ou menos 70 pb do sítio de policlonagem do vetor pUC19 (FIGURA 6).

FIGURA 6 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS CLONES DE *mucR* Del EM pUC19.

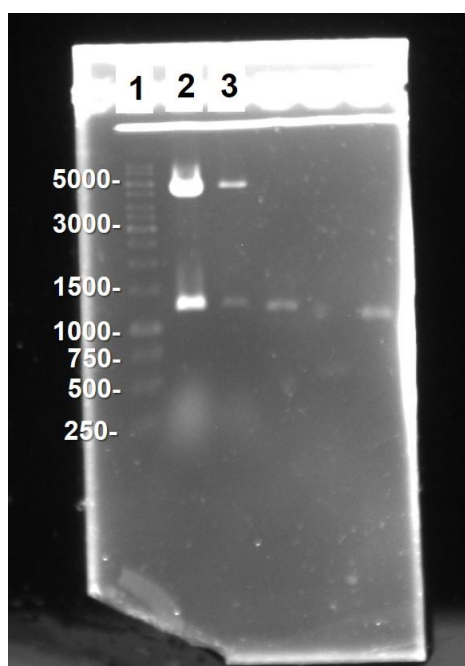


LINHA 1 – Marcador 1 Kb DNA ladder; LINHA 2 - pTZ57R/T-*mucR*2, DIGERIDO COM *EcoRI* e *XbaI* LIBERANDO FRAGMENTO DE 650 pb; LINHA 3 – pUC19-*mucR*/Del DIGERIDO COM *BamHI* e *EcoRI* LIBERANDO O FRAGMENTO DE APROXIMADAMENTE 1260 pb, QUE CONTEM O FRAGMENTO *mucR*/Del MAIS 70 pb DA REGIÃO DE POLICLONAGEM DO VETOR.

FONTE: O autor (2018).

Este mesmo par de enzimas foi utilizado para liberar o fragmento *mucR*/Del do plasmídeo pUC19-*mucR*/Del, para ser inserido no vetor de clonagem pK18mobsacB com resistência a canamicina. O plasmídeo construído com a sequência correta e dentro do vetor de dupla seleção foi extraído e confirmado pela digestão com as mesmas enzimas e denominado pK18-*mucR*/Del (FIGURA 7). Este plasmídeo foi transformado em células de *E. coli* S17.1 que são capazes de fazer a conjugação com outras bactérias através do *pili* sexual, incluindo NGR234.

FIGURA 7 – ELETROFORE EM GEL DE AGAROSE DOS CLONES DE mucR/Del EM pK18mobsacB.



LINHA 1 – Marcador 1 Kb DNA ladder; LINHA 2 a 3 – pK18-mucR/Del DIGERIDO COM *Bam*HI E *Eco*RI LIBERANDO O FRAGMENTO DE 1197 pb, MAIS 70 pb DO SÍTIO DE POLICLONAGEM DO VETOR pUC19 USADO PARA TRANSFERÊNCIA DO INSERTO ENTRE OS VETORES.

FONTE: O autor (2018).

#### 4.1.1 OBTENÇÃO DOS CONJUGANTES DE *Sinorhizobium fredii* NGR234 COM O PLASMÍDEO pK18-mucR/Del.

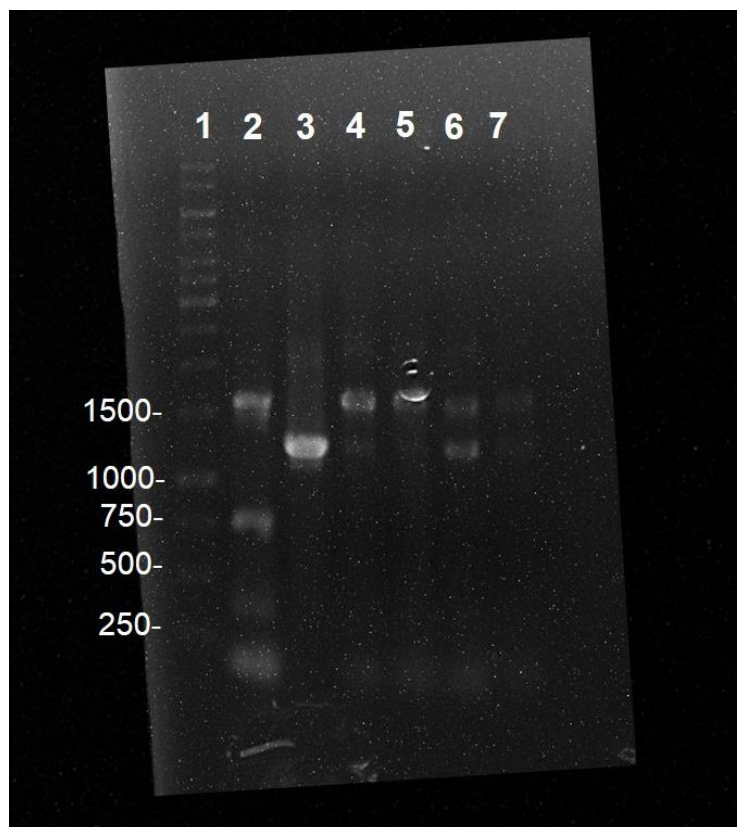
Para obtenção dos conjugantes, células de *S. fredii* NGR234 foram cultivadas em placa contendo meio sólido de TY e células de *E. coli* S17.1 contendo o plasmídeo pK18-mucR/Del em meio LA. As duas massas de células foram adicionadas a uma placa sem antibiótico por 24 horas contendo meia parte de TY e meia parte de LA. Após as 24 horas a massa de células resultantes foi raspada e dissolvida em meio TY líquido. Estas células foram distribuídas em meio contendo rifampicina e canamicina para selecionar apenas células de *S. fredii* NGR234 que tenham recebido o plasmídeo.

As colônias resultantes foram utilizadas para confirmação dos simples recombinantes de *S. fredii* NGR234 com inserção do plasmídeo pK18-mucR/Del em seu genoma. O DNA destas colônias foi submetido a reações de PCR utilizando os



primers pmucR for e dmucR 4. O resultado mostra a amplificação do fragmento de 1565 pb contendo o gene *mucR* completo e/ou o fragmento de 1197 pb contendo o gene truncado (FIGURA 8).

FIGURA 8 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM OS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS RESULTANTE DA PCR COM OS PRIMERS pmucR for E dmucR 4.



LINHA 1 – Marcador 1 Kb DNA ladder; LINHA 2– NGR234 SELVAGEM AMPLIFICANDO FRAGMENTO TOTAL DO GENE *mucR* COM 1565 pb. LINHA 3 – S17.1 COM pK18-*mucR*/Del AMPLIFICANDO FRAGMENTO TRUNCADO DE 1197 pb. LINHA 4, 5, 6 E 7 – COLÔNIAS DE NGR234 COM INSERÇÃO DO PLASMÍDEO pK18-*mucR*/Del NO GENOMA PRESENÇA DAS 2 BANDAS DO GENE.

FONTE: O autor (2018).

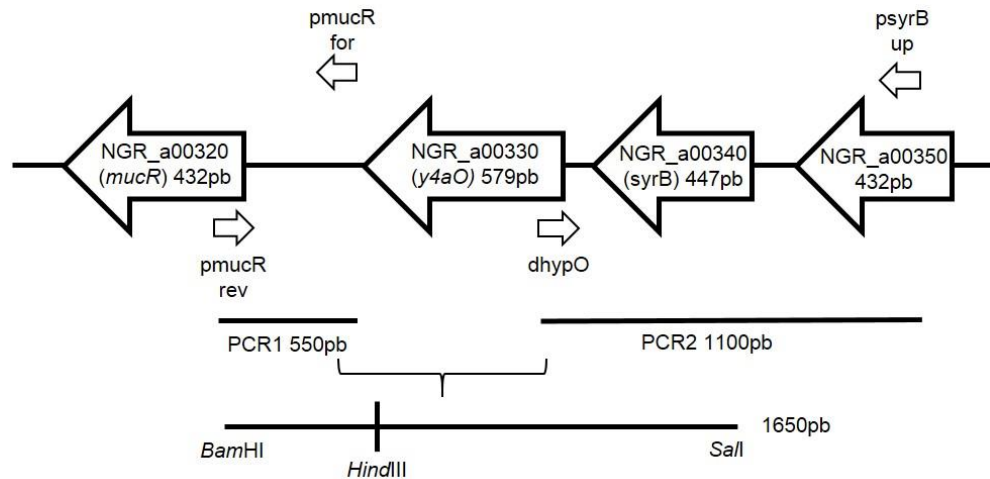
#### 4.2 OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS PARA CONSTRUÇÃO DO *y4aO*/Del PARA DELEÇÃO EM FASE POR DUPLA RECOMBINAÇÃO COM NGR234

A porção genômica que contém o gene *y4aO* e foi utilizada para amplificar os fragmentos de interesse tem um total de 2186 pb entre os primers mais afastados *psyrB* up e *pmucR* for. Os fragmentos juntos para compor a deleção contam com 1650



pb, removendo um total de 536 pb do gene que totaliza 579 pb (FIGURA 9).

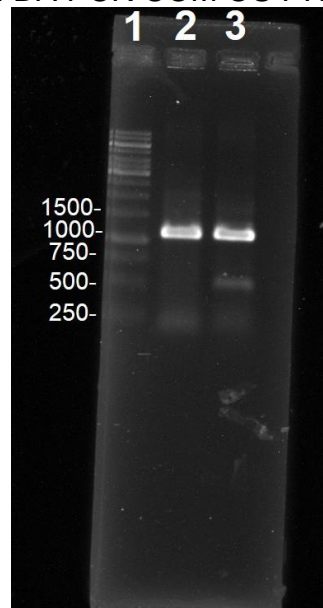
FIGURA 9 – REGIÃO GENÔMICA DE INSCERÇÃO DOS GENES E PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS PARA DELEÇÃO DO GENE *y4aO*.



FONTE: O autor (2018).

O primeiro fragmento utiliza o fragmento 1 (PCR1) já citado anteriormente, que foi obtido e confirmado por LEITE, 2014. Para o fragmento 2 (PCR2) com 1100 pb foram utilizados os primers psyrB UP e dhypO (FIGURA 10).

FIGURA 10 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM FRAGMENTO AMPLIFICADO RESULTANTE DA PCR COM OS PRIMERS psyrUP E dhypO.

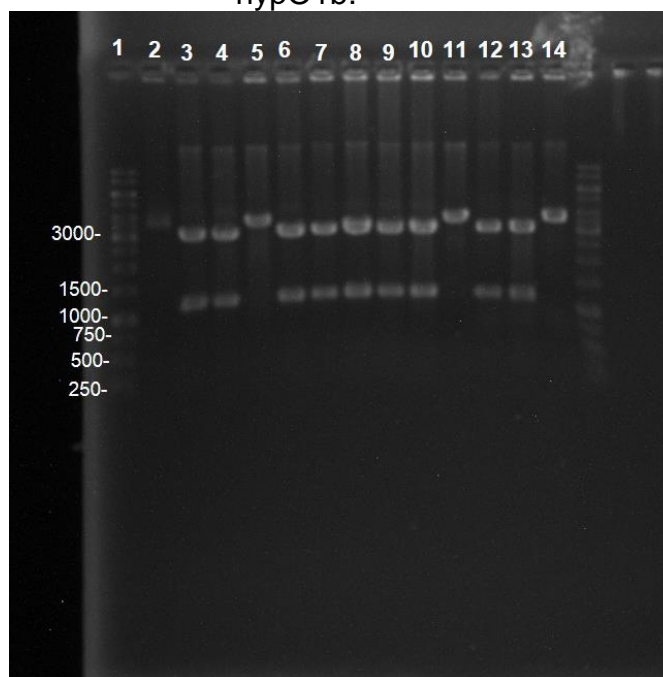


LINHA 1 – Marcador 1 Kb DNA ladder; LINHA 2 E 3 – FRAGMENTO COM 1100 pb.  
FONTE: O autor (2018).

Este fragmento, denominado de fragmento 2, foi inserido no vetor pTZ57R/T

dando origem ao plasmídeo pTZ57R/T-hypO1b. A presença do fragmento nos plasmídeos foi confirmada pela digestão com as enzimas *Hind*III e *Sal*I (FIGURA 11).

FIGURA 11 – ELETROFORE EM GEL DE AGAROSE DOS CLONES DE pTZ57R/T-hypO1b.



LINHA 1 – Marcador 1 Kb DNA ladder; LINHA 2, 5, 11 e 14 – pTZ57R/T DIGERIDO COM *Hind*III E *Sal*I SEM O FRAGMENTO DE INTERESSE. LINHA 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12 E 13 CLONES COM FRAGMENTO DE INTERESSE DE 1100pb DIGERIDOS POR *Hind*III e *Sal*I.

FONTE: O autor (2018).

Os Fragmentos 1 e 2 que formam o fragmento y4aODel foram clivados com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III, e *Sal*I e *Hind*III, respectivamente, e purificados do gel utilizando o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). Estes fragmentos foram ligados diretamente ao vetor pK18mobsacB que foi previamente digerido com as enzimas das extremidades *Bam*HI e *Sal*I. A reação de ligação foi transformada em células DH10B e os possíveis clones serão avaliados.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados visam a obtenção de estirpes mutantes de *S. fredii* NGR234 para os genes *mucR* e *y4aO*. Estes genes são vizinhos ao gene *nodD1*, o qual está diretamente envolvido na cascata de regulação da nodulação. Portanto a caracterização dos genes *mucR* e *y4aO* irão contribuir para a elucidação melhor dessas vias.

As construções para deleção em fase através de dupla recombinação com o genoma de *S. fredii* NGR234 foram obtidas para ambos os genes. Foram obtidas estirpes de *S. fredii* NGR234 simples recombinante, contendo a inserção do fragmento com o gene truncado *mucR*/Del mais o plasmídeo pK18mobsacB no genoma da bactéria. Entre os próximos passos está a obtenção de uma estirpe duplo recombinante através da adição de Sacarose no meio, ativando a dupla seleção do plasmídeo e só sobrevivendo células que eliminarem o plasmídeo com o gene selvagem. As colônias serão testadas por PCR para comprovar a inserção do gene truncado e a deleção do gene selvagem.

O gene *y4aO* seguirá as mesmas etapas para obtenção do simples recombinante e duplo recombinante para obtenção da estirpe mutante com a deleção do gene em fase.

Após a obtenção dos mutantes, o fenótipo destas estirpes será avaliado em ensaios de nodulação.

## REFERÊNCIAS

- BARNETT, M. J.; LONG, S. R. Identification and characterization of a gene on *Rhizobium meliloti* *pSyma*, *syrB*, that negatively affect *dysM* expression. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, n. 5, p. 550 – 559, 1997.
- BARTSEV, A.; KOBAYASHI, H. AND BROUGHTON, W. J. Rhizobial signals convert pathogens to symbionts at the legume interface. In: GILLINGS, M. AND HOLMES, A. Plant Microbiology (Ed.). **Garland Science / BIOS Scientific**, Abingdon, UK, p. 19–31, 2004.
- DENARIE, J.; DEBELLE, F.; ROSENBERG, C. Signaling and Host Range Variation in Nodulation. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 497–531, 1992.
- DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L.; REIS, V. M. The role of biological nitrogen fixation to bio-energy programmes in the tropics. **EMBRAPA**, 2000.
- GEURTS, R.; FEDOROVA, E.; BISSELING, T. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. **Curr Opin Plant Biol**, Wageningen, v. 8, n. 4, p. 346-52, jun. 2005.
- HUNGRIA, M; VARGAS, M. A T.; ARAÚJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. *Biologia dos solos dos Cerrados*. **EMBRAPA-CPAC**, Planaltina, D. F., p.188-294, 1997.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.; CHUEIRE, L.; GRANGE, L.; MEGÍAS, M. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brasil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.33, n.5, p.387-394, 2001.
- KAMBARA, K.; ARDISSONE, S.; KOBAYASHI, H.; SAAD, M. M.; SCHUMPP, O.; BROUGHTON, W. J. E DEAKIN, W. J. Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis. **Molecular microbiology**. (2009) 71(1), 92-106. (a)

KELLER, M.; ROXLAU, A.; WENG, W.M.; SCHIMIDT, M.; QUANDT, J.; NIEHAUS, K.; JORDING, D.; ARNOLD, W.; PÜHLER, A. Molecular analysis of the *Rhizobium meliloti* mucR gene regulating the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoglucan. **Mol Plant Microbe Interact.** 1995 Mar-Apr;8(2):267-77.

KLEINER, D.; PAUL, W.; MERRICK, M. Construction of multicopy expression vectors for regulated over production of protein in *Klebsiella pneumoniae* and other enteric bacteria. **J. Gen. Microbiol.**, v.134, p. 1779-1784, 1988.

KOBAYASHI, H.; BROUGHTON, W. J.; BIOLOGIE, L. DE; SUPÉRIEURES, P. Chapter 5 fine-tuning of symbiotic genes in rhizobia: flavonoid signal transduction cascade. **Media**, p. 117–152, 2008.

LEITE, D. S. C.; Análise **Funcional do gene *syrB* de *rhizobium* sp. NGR234** Trabalho de Graduação (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2014.

MARIE, C.; DEAKIN, W. J.; VIPREY, V.; KOPCINSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; KRISHNAN, H. B.; PERRET, X.; BROUGHTON, W. J. Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, p. 743–751, 2003.

MILLER, W. G.; LEVEAU, J. H.; LINDOW, S. E. Improved gfp and inaZ broad-host-range promoter-probe vectors. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 13, n. 11, p. 1243–1250, 2000.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 64, n. 1, p. 180–201, 2000.

PUEPPKE, S.G., AND BROUGHTON, W.J. (1999) *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. **Mol Plant Microbe**

**Interact** 12: 293–318.

SANTI C, BOGUSZ D, FRANCHE C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**.111 (5):743-767; 2013.

SCHÄFER, A.; TAUCH, A.; JÄGER, W.; KALINOWSKI, J.; THIERBACH, G.; PÜHLER, A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. **Gene**, n. 145, p. 69–73, 1994.

SCHMEISSER, C.; LIESEGANG, H.; KRYSCIAK, D.; et al. Rhizobium sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 12, p. 4035–4045, 2009.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **Bio/Technology**, v. 1, p. 784-790. 1983.

SMITH, B. E. Nitrogenase reveals its inner secrets. **Science**, v.297, p.1654-1655, 2002.

TRINICK, M.J. Relationships amongst the fast growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. **Journal of Applied Bacteriology**. 49: 39-53, 1980.